

機能性食品開発への基盤研究

～抗炎症機能性食由来成分の単離ならびに分子作用機序の解明～

高橋正和

1. はじめに

日本人の死因の上位は、がんや脳血管疾患・心血管疾患などの生活習慣病が占めている¹⁾。これら疾患の治療法は医学の進歩と共に高度化が進み長寿化の恩恵をもたらしたが、一方で超高齢化社会を迎え国民医療費の増大が深刻化している。また生活の質の観点から考えても、医薬品等による治療が必要となる前に、生活習慣の改善によって疾患を「予防」する重要性が増している。

生活習慣病の基盤病態には慢性炎症が深く関与し、多様な炎症性疾患の原因となっている。食細胞(好中球・マクロファージ)は、微生物感染に応答してスーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^-)や一酸化窒素(NO)を産生する。これらラジカルから生じる多様な活性酸素種(ROS)や活性窒素種(RNS)は、感染微生物の殺菌・分解に利用されるなど、生体防御機構において重要な役割を果たしている。しかし慢性炎症局所におけるROSやRNSの過剰産生は、正常な細胞や生体組織を傷害し、生活習慣病に見られる多くの酸化ストレス障害や炎症性疾患の原因となる^{2, 3)}。したがってROSやRNSの過剰産生抑制は、慢性炎症性疾患の予防にとって重要な課題である。とりわけ日常の食および食由来因子による慢性炎症の制御は、重要かつ現実的な課題として注目され、これまでに国内外で精力的な研究が展開されている。

以上の背景から、食素材に含まれる抗炎症機能成分の単離ならびに作用機序解析、*in vivo*抗炎症活性の検討を行った。また食品は多様な化合物からなる混合系であり、その真の働きを論じるには、複数の化合物間の相互作用(相乗/相加/相殺作用)をも考慮に入れなければならない。そこで各種食由来化合物について、NO産生抑制活性における増強効

果の有無を検討した。

2. 材料・方法

1) 農作物

木田チリメンシソ(木田ちそ)は木田ちそ出荷組合(福井市)から、ホウレンソウは合同会社光合星(福井市)より入手した。

2) O_2^- 産生測定

ヒト前骨髄性白血病細胞株HL-60(理化学研究所バイオリソースセンター)は、10%ウシ胎仔血清(FBS)、100 U/mlペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加したRPMI-1640培地(R-8758; Sigma)で37°C、5%CO₂下にて培養した。HL-60細胞を1.25%ジメチルスルホキシド(DMSO)で1週間処理して好中球様に分化誘導させた後、Hanks液(137 mM NaCl, 5 mM KCl, 16 mM MgSO₄, 0.2 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 4 mM NaHCO₃, 6 mM D-グルコース)にて洗浄・懸濁した^{4, 5)}。この分化細胞を、12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA; 和光純薬工業)で刺激すると、 O_2^- が産生される。この O_2^- の作用でWST-1(同仁化学)から生じるホルマザンをAbs.450nm によって測定した⁶⁻⁸⁾。この測定系において、分化HL-60をサンプル存在下でTPA刺激し、Abs.450 nm の増加抑制率から O_2^- 産生阻害活性を評価した(図1)。分化HL-60、WST-1、TPAはそれぞれ終濃度 5×10^5 cells/ml、25 μ g/ml、2 ng/ml とし、37°Cで1時間反応させた。

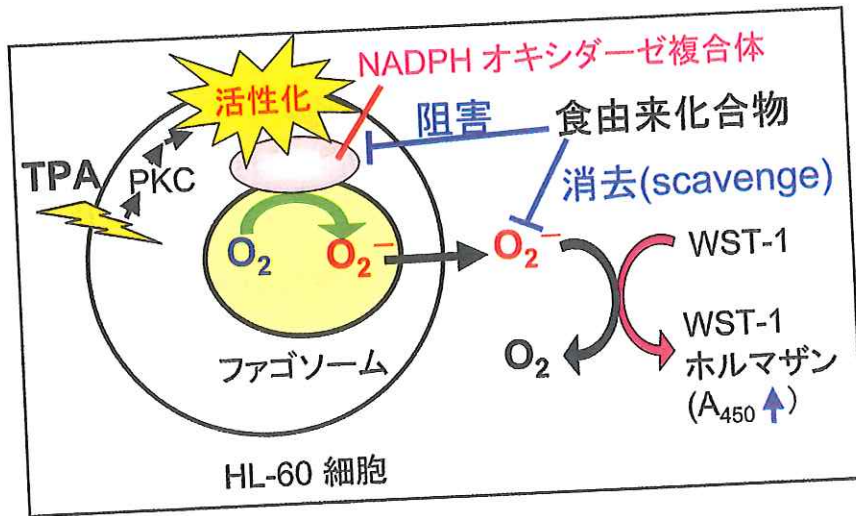


図1. 分化HL-60細胞を用いた O_2^- 産生抑制アッセイ系

3) NO産生測定

マウスマクロファージ様細胞株RAW264(理化学研究所バイオリソースセンター)は、4mM L-Gln、10%FBS、100 U/mlペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加したMEM(10370; Life Technologies)で37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下にて継代培養した。RAW264を 2×10^5 cells/ml に調製し、100 ng/ml リポ多糖(LPS, 大腸菌0111:B4由来; 和光純薬)と100 U/ml 組換え型マウスインターフェロン- γ (IFN- γ ; R&D systems)と共に24穴または96穴プレートに播種して37 $^{\circ}$ C、5%CO₂にて培養し、NOを産生させた。24時間後に細胞培養上清を回収して等量のGriess反応試薬(0.5% sulfanilamide, 2.5% H₃PO₄, 0.05% *N*-(1-naphty) ethylenediamine dihydrochloride)と混合し、細胞外に放出されたNOより生成する亜硝酸イオンとGriess試薬が反応して生じるジアゾ化合物を Abs._{543 nm} によって測定した^{9, 10} (図2)。この測定系において、RAW264をサンプル存在下でLPSおよびIFN- γ で刺激し、Abs._{543 nm}の増加抑制率からNO産生阻害活性を評価した。

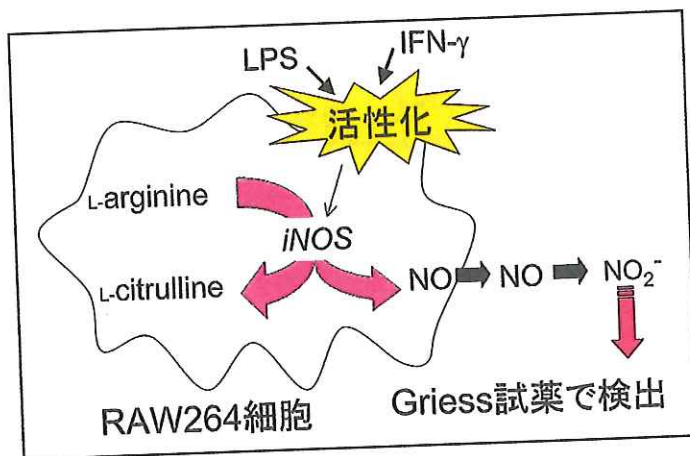


図2. RAW264細胞を用いたNO産生抑制アッセイ系

4) 耳介浮腫抑制試験

マウス耳介浮腫抑制試験は、ジニトロフルオロベンゼン(DNFB)の塗布による接触過敏反応(IV型アレルギー)抑制試験法を用いて検討した¹¹⁾。ICRマウス(メス, 6週齢)を日本クレアより購入し、CE-2通常食(固形食)で1週間予備飼育した(4匹/ケージ)。次にCE-2粉末食で1週間予備飼育し、最終日の2日前に背部体毛を専用バリカンで刈ると共に、1匹/ケージによる飼育に変更した。これらの予備飼育の間、毎日体重を測定し、飼育環境と体重測定に馴化させた(図3)。次にDNFB(Sigma)をアセトン-大豆油(4:1)混合液で希釈して0.5%溶液を調製し、背部に100μLずつ塗布した(感作)。この時、コントロール群は溶媒のみを塗布した。同時に木田ちそエタノール(EtOH)抽出物を終濃度0~0.2%(w/w)となるようにCE-2粉末食に混餌した試験食に切替え、さらに一週間毎日体重と摂食量を測定した。最終日の前日に前述の0.5% DNFB希釈液をマウスのどちらか一方の耳に20μLずつ塗布した(コントロール群は溶媒のみを塗布)。約20時間後に安楽死させた後、生検トレパン(φ5mm)(カイインダストリーズ株式会社)で耳介生検を採取し、その重量を測定した。

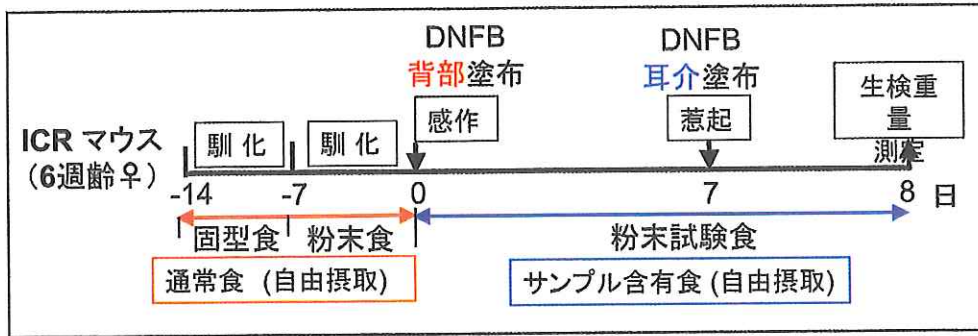


図3. マウス耳介浮腫抑制試験スケジュール

3. 結果・考察

1) シソおよびホウレンソウからのラジカル産生抑制成分の単離・作用機序解析

木田チリメンシソ(以下、木田ちそ)は、チリメンシソ(*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *crispa*)の一種であり、明治から栽培される福井県産の地方伝統野菜である¹²⁾。木田ちそ新鮮葉1.5 kgよりメタノール(MeOH)抽出物を調製し、酢酸エチル可溶画分を調製したところ、DMSO分画HL-60細胞において O_2^- 産生を抑制顕著に抑制した。この抽出物をWako-gel C-300 カラム(ヘキサン:アセトンstepwise法)、Wako-gel B-0 カラム(トルエン:酢酸エチルstepwise法)、逆相HPLC(ODSカラム)(100% MeOH)を用いて連続的に分画し、活性化化合物85 mgを得た。この活性化化合物をEI-MS, 1H NMR, ^{13}C NMRなどの各種機器分析に供し、1,2-di-*O*- α -linolenoyl-3-*O*- β -galactosyl-*sn*-glycerol (DLGG)を同定した¹³⁾(図4)。DLGGは用量依存的な O_2^- 産生阻害を示し($IC_{50} = 21 \mu M$)、その強さはシソ類に豊富なロスマリン酸(RA) ($IC_{50} = 29 \mu M$)に匹敵した。またDLGGに2残基含まれる α -リノレン酸(α -LA)はDLGGの約2倍の活性を示した($IC_{50} = 9.2 \mu M$)(図5)。ところで分化HL-60細胞を用いた本アッセイ系では、活性化化合物が O_2^- の産生反応を阻害しているのか、それとも産生された O_2^- を消去しているのか、については分からない(図1)。そこでキサンチンオキシダーゼ(XO)の酵素活性を利用して無細胞系で O_2^- を産生できるキサンチン-XO系にて化合物の作用点を検討した(図6)。RAは O_2^- スカベンジャーとして働くため¹⁴⁾、この系でも O_2^- 消去活性を示したが、DLGGや α -LAは活性を示さなかった(図7)。このことから、DLGGや α -LAは分化HL-60細胞においてNADPHオキ

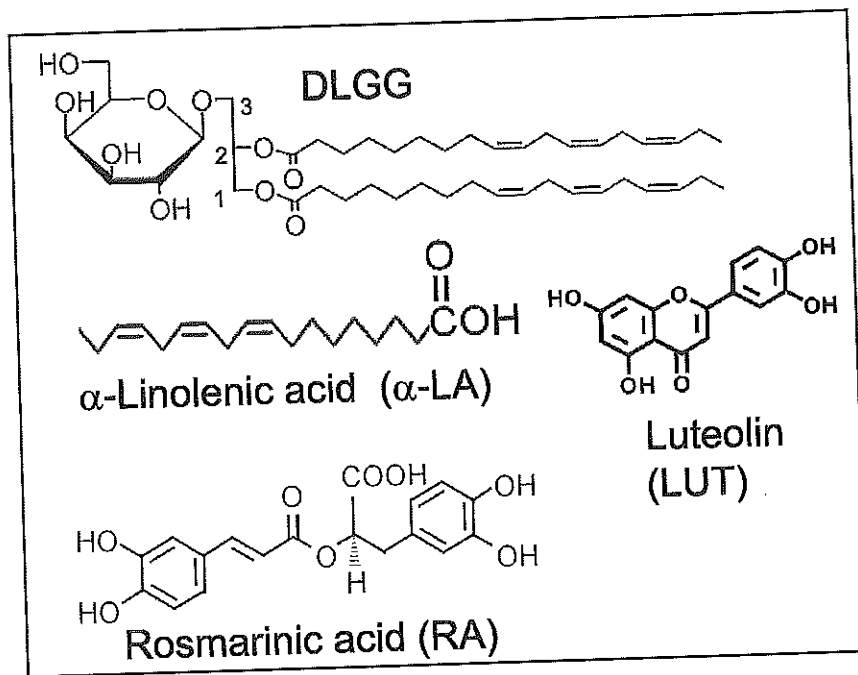


図4. DLGG, α -リノレン酸(α -LA), RA, ルテオリン(LUT)の構造

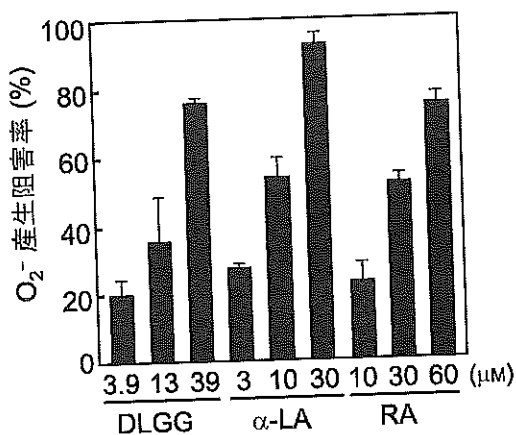


図5. 分化HL-60細胞に対するDLGG, α -LA, RAのO₂⁻産生阻害活性

シダーゼによるO₂⁻産生反応を抑制していることが示唆された。またシソ抽出物にはDLGGとRAという作用機序の異なる化合物(O₂⁻産生抑制および消去化合物)が共存していることが示された。

ところでDLGGについてはRAW264細胞系においてNO産生抑制効果が報告されている¹⁵⁾。そこで単離されたDLGGについて活性を検討したところ、たしかにDLGGには用量依存的なNO産生抑制活性が認められること、さらにO₂⁻産生抑制

活性とは異なり、 α -LAはNO産生抑制活性を示さないことが明らかとなった(図8)。したがってDLGGはO₂⁻とNO双方のラジカル産生を抑制できることが明らかとなった。RAW264細胞を

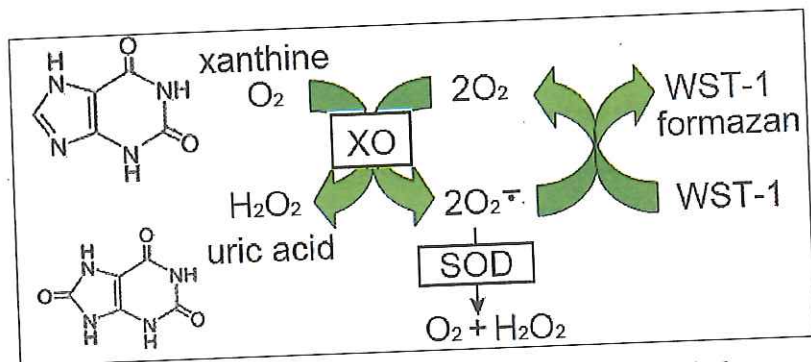


図6. Xanthine-Xanthine oxidase (XO) 系による O_2^- 産生測定系

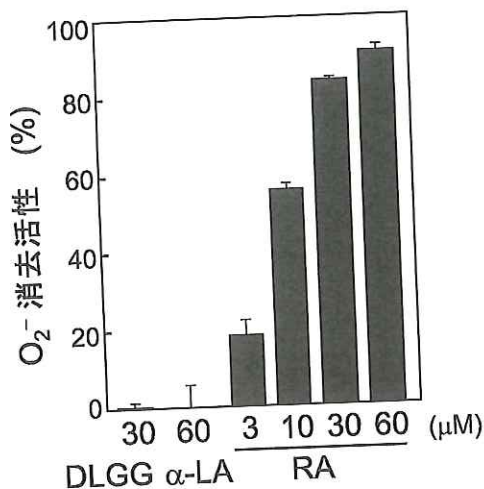


図7. Xanthine-XO系による O_2^- 消去活性測定

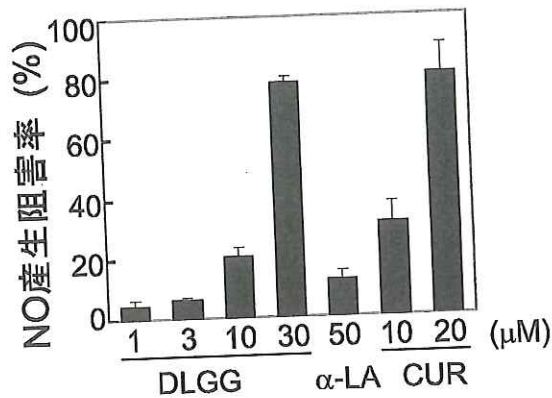


図8. RAW264細胞に対するDLGG, α -LAのNO産生阻害活性

LPSや $IFN-\gamma$ で刺激すると誘導型NO合成酵素(iNOS)が合成されてNOが産生される(図2)。そこでWestern解析によって作用機構解析を試みたところ、クルクミン(CUR)と同様、iNOSタンパク質の誘導抑制によることが確認された(図9)。

DLGGをはじめとするガラクトグリセロ脂質は、植物の葉緑体に多量に含まれ、チラコイド膜の構成脂質として必須な役割を果たしている¹⁶⁾。またホウレンソウには特に多量に含まれていることも報告されている¹⁷⁾。そこでホウレンソウ110gをアセトン抽出し、その酢酸エチル可溶画分(880mg)より、Wako-gel C-300カラム、Wako-gel B-0カラム、逆相HPLC(ODSカラ

ム)による3段階連続精製により、関連化合物3種類の単離に成功した(図10)。これらはESI-MSおよびMSⁿ解析等よりmonogalactosyl diacylglycerol (MGDG) (18:3/18:3) (78 mg)、MGDG (18:3/16:3) (36 mg)、digalactosyl diacylglycerol (DGDG, 18:3/18:3) (19 mg) と示唆された(MGDG (18:3/18:3)はDLGG)。これら3種の化合物についてNO産生抑制活性を比較したところ、図10に示すように2種のMGDGはほぼ同等の活性を示すこと、DGDGはMGDGの約半分の比活性を示すことが示された。

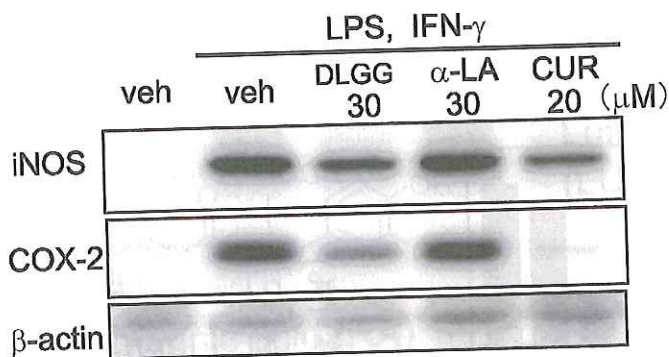


図9. Western解析によるDLGGのiNOSおよびCOX-2タンパク質誘導抑制活性の検討
COX-2:シクロオキシゲナーゼ-2

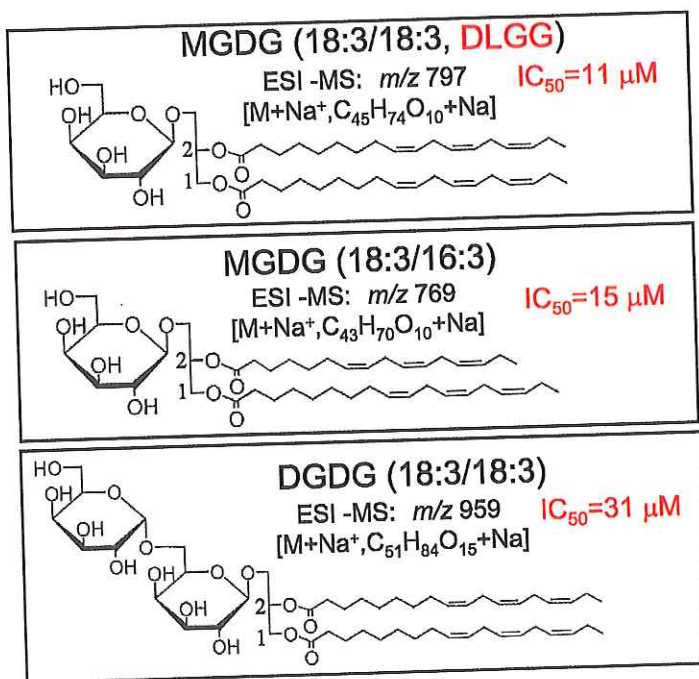


図10. ホウレンソウより単離したNO産生抑制化合物

2). 木田ちそ抽出物の *in vivo* 抗アレルギー作用

食由来化合物の効果を議論するためには、*in vitro*の細胞実験だけでは不十分であり、最低でも動物経口投与試験が必要である。シソには抗酸化・抗炎症性分としてRAやルテオリン(LUT)などが報告されており、抗酸化作用・抗炎症作用・抗アレルギー作用について多くの報告がなされている^{19, 20}。そこで、木田ちその抗アレルギー作用を検討するため、DNFBの塗布による接触過敏反応(IV型アレルギー反応)への抑制効果について検討した¹¹。木田ちそ新鮮葉 1.5 kgをEtOH 3 Lに2週間以上浸漬し、得られた抽出物を綿ろ過して木田ちそ

抽出物を調製した。抽出試料中のDLGGを逆相HPLC(ODSカラム)(水-MeOH gradient溶出法)によって Abs.210 nm を基に定量したところ、 $160 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$ ($n = 3$)と決定された。またRA含量も同様に逆相HPLC分析(ODSカラム; 溶出溶媒25% アセトニトリル, 0.3% ギ酸

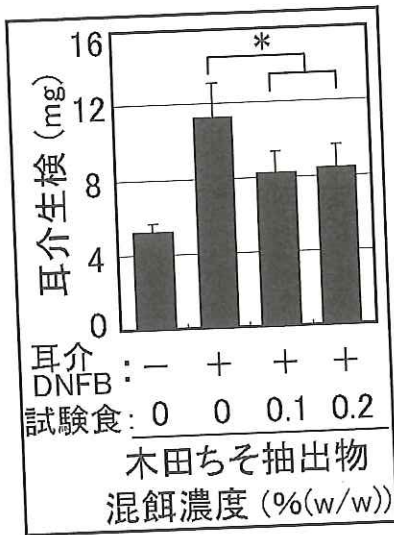


図11. 木田ちそ抽出物のマウス耳介浮腫抑制活性 (*, $p < 0.01$; $n = 5$)

isocratic溶出法)(Abs.280 nmで定量)より、 $220 \pm 40 \mu\text{g/mL}$ ($n = 3$)と決定され、DLGGやRAは十分抽出されていることが確認された。

木田ちそEtOH抽出物を用いて0, 0.1, 0.2% (w/w) 混合食を調合し、マウスに自由摂食させ、DNFB誘発耳介浮腫への抑制効果を検討

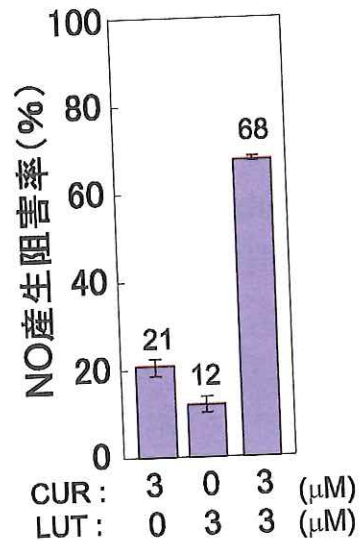


図12. NO産生抑制におけるCUR-LUT間の増強効果

した。その結果、0.1および0.2% 摂取群では、0% 摂取群と比較して、有意に耳介浮腫(接触過敏反応)が抑制されることが示された(図11)。

3) NO産生抑制化合物の増強作用解析

食品は多様な化合物からなる混合系であり、耳介浮腫抑制効果を示したシソ抽出物にもDLGGやRAのほか多様な化合物が含まれている。そこで多成分系における食由来抗炎症性化合物の効果を広く調べるため、これまでに精製した化合物だけでなく市販化合物も含めて多様なNO産生抑制化合物について増強効果の有無を検討することにした。

一次スクリーニングとして、フラボノイド、クルクミノイド、レスベラトロールなども含めてランダムな組合せを検討したところ、いくつかの化合物について明瞭な増強効果が期待される結果が得られた。その中でも特に強い増強効果を示した組合せについて、さらに濃度を振って検討した結果、CURとLUTの間に明らかな増強効果が確認された(図12)。

4. おわりに

木田ちそ抽出物は、これまでのシソ抽出物の報告²⁰⁻²²⁾と同様、*in vivo* 経口投与系にて抗アレルギー作用を示した。抽出物には複数の抗炎症性化合物が含まれるため、*in vivo* 抗アレルギー作用が単一の化合物による作用とは限らない。異なる機序で作用する複数の化合物が同時に働くことで相乗的な作用を発揮している可能性も考えられる。

化合物間の増強効果を検討したところ、CURとLUTがNO産生抑制活性において、増強効果を示すことが示された。図12の効果が相乗効果か相加効果なのかについては詳細な解析が必要であるが、追加試験の結果より相乗効果を支持する結果が得られている。

謝辞

本研究の一部は、財団法人杉山産業化学研究所より賜りました研究助成の支援によって行われました。心より感謝申し上げます。

引用文献・引用サイト

- 1) 政府統計:平成24年人口動態統計月報年計(概数)の概況. 厚生労働省
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai12/dl/gaikyou24.pdf>
- 2) Lubos E, Handy DE, Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis., *Front Biosci.*, **13**, 5323-5344 (2008).
- 3) Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, iNOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals., *Int. J. Cancer*, **121**, 2357-2363 (2007).
- 4) Eguchi A, Murakami A, Ohigashi H. Novel bioassay system for evaluating anti-oxidative activities of food items: use of basolateral media from differentiated Caco-2 cells., *Free Radic Res.*, **39**, 1367-1375 (2005).
- 5) Carrigan SO, Weppler AL, Issekutz AC, Stadnyk AW. Neutrophil differentiated HL-60 cells model Mac-1 (CD11b/CD18)-independent neutrophil transepithelial migration. *Immunol.* **115**, 108-117 (2005).
- 6) Tan AS, Berridge MV. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J. Immunol. Methods*, **238**, 59-68 (2000).
- 7) Ukeda H., Kawana D, Maeda S, Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 485-488 (1999).
- 8) 受田浩之. WST-1を用いたスーパーオキシドアニオンの検出とその応用. *Dojin News*, **112**, 1-8 (2004).
- 9) Kim OK, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW264.7 cells. *Cancer Lett.*, **125**, 199-207 (1998).
- 10) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluid. *Anal. Biochem.*, **126**, 131-138 (1982).

- 11) Sakai S, Sugawara T, Kishi T, Yanagimoto K, Hirata T. Effect of glucosamine and related compounds on the degranulation of mast cells and ear swelling induced by dinitrofluorobenzene in mice., *Life Sci.*, **86**, 337-343 (2010)
- 12) 伝統の福井野菜振興協議会:「伝統の福井野菜」(福井県農林水産部販売開拓課), 1-20 (2011).
- 13) Takahashi M, Sugiyama Y, Kawabata K, Takahashi Y, Irie K, Murakami A, Kubo Y, Kobayashi K, Ohigashi H. 1,2-Di-*O*- α -linolenoyl-3-*O*- β -galactosyl-*sn*-glycerol as a superoxide generation inhibitor from *Perilla frutescens* var. *crispa*., *Biosci Biotechnol Biochem.*, **75**, 2240-2242 (2011).
- 14) Nakamura Y, Ohto Y., Murakami A, Ohigashi H. Superoxide scavenging activity of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* f. *viridis*. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4545-4550 (1998).
- 15) Hou CC, Chen YP, Wu JH, Huang CC, Wang SY, Yang NS, Shyur LF, A galactolipid possesses novel cancer chemopreventive effects by suppressing inflammatory mediators and mouse B16 melanoma *Cancer Res.*, **67**, 6907-6915 (2007).
- 16) Christensen LP. Galactolipids as potential health promoting compounds in vegetable foods., *Recent Patents Food Nutr. Agric.*, **1**, 50-58 (2009).
- 17) Wang R, Furomoto T, Motoyama K, Okazaki K, Kondo A, Fukui H. Possible anti-tumor promoters in *Spinacia oleracea* (spinach) and comparison of their contents among cultivars. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 248-254 (2002).
- 18) Makino T, Furuta Y, Fujii H, Nakagawa T, Wakushima H, Saito K, Kano Y. Effect of oral treatment of *Perilla frutescens* and its constituents on type-I allergy in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 1206-1209 (2001).
- 19) Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses.: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, **25**, 549-557 (2004).
- 20) Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol Pharm Bull*, **25**, 1197-202 (2002).

- 21) Takano H, Osakabe N, Sanbongi C, Yanagisawa R, Inoue K, Yasuda A, Natsume M, Baba S, Ichiishi E, Yoshikawa T. Extract of *Perilla frutescens* enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. *Exp. Biol. Med.*, **229**, 247-254 (2004).
- 22) Oh HA, Park CS, Ahn HJ, Park YS, Kim HM. Effect of *Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo and rosmarinic acid on allergic inflammatory reactions. *Exp. Biol. Med.*, **236**, 99-106 (2011).